Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
ehemal. Direktor: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

Untersuchungen über das Wesen der Hämophilie A mit Hilfe immunologischer Methoden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Max H. Schreier
aus Mamming

1965

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
im Städtischen Krankenhaus Westend
ehemal. Direktor: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

Untersuchungen über das Wesen der Hämophilie A mit Hilfe immunologischer Methoden

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Max H. Schreier
aus Mamming

Dekan: Professor Dr. med. Adalbert Loeschke

Referent: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

Korreferent: Professor Dr. med. Heinrich Gerhartz

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 18. 9. 1965

EINLEITUNG

Die klassische Hämophilie (Hämophilie A) konnte in den letzten zehn Jahren durch die Verbesserung der experimentellen Untersuchungsmethoden und die Entdeckung neuer Gerinnungsfaktoren eindeutig gegen andere Störungen der Blutgerinnung mit ähnlicher Symptomatik abgegrenzt werden. Sie stellt eine rezessive, geschlechtsgebundene Erbkrankheit dar, die heute allgemein auf die verminderte Aktivität bzw. den Funktionsausfall eines spezifischen Plasmafaktors (Antihämophiles Globulin, Faktor VIII, Plättchen-Cofaktor I) zurückgeführt wird. Als primäre Ursache dieses Defektes werden in der Literatur folgende Möglichkeiten diskutiert:

1. ein teilweises oder völliges Fehlen dieses Faktors,
2. das Vorliegen eines Inhibitors, der das in normaler Menge vorhandene Antihämophile Globulin in seiner Wirksamkeit unterdrückt und
3. eine Proteinfehlsynthese, das heißt die Produktion eines abartigen, funktionell minderwertigen Genproduktes an Stelle des normalen Faktor VIII-Moleküls.

Die erstgenannte Ansicht kann sich auf das Vorkommen eindeutiger Proteindefekte, wie die Analbuminämie und Afibrinogenämie stützen. Sie ist am weitesten verbreitet und läßt sich vor allem damit begründen, daß die Gerinnungsstörung in vitro mit kleinen Mengen normalen Plasmas bzw. einer Faktor VIII-haltigen Fraktion normalisiert werden kann. Dies findet sinngemäß Anwendung in der allgemein geübten Substitutionstherapie. Ein weiteres Argument für diese Anschauung ist das gelegentliche Auftreten von Immunohemmkörpern gegen Faktor VIII während der Behandlung, da Antikörper im allgemeinen nur gegen körperfremde Antigene gebildet werden. Einige Befunde lassen sich jedoch mit dieser Faktor VIII-Mangel-Hypothese allein nicht erklären. Nach BIGGS (1) sind es die wechselnde Schwere des Krankheitsbildes bei konstantem Ergebnis der Gerinnungsanalyse, das häufige Mißverhältnis zwischen vorausberechnetem Faktor VIII-Plasmaspiegel, und erzielter korrigierender Wirkung bei der Transfusionsbehandlung von Bluterpatienten, und die verbesserte Gerinnbarkeit des hämophilen Plasmas in vitro nach Behand-

lung mit Asbest, Glaspulver, Kaolin usw.

Diese und andere klinische und experimentelle Befunde bilden die Grundlage der Inhibitortheorie der Bluterkrankheit. Sie wurde zuerst von TOCANTINS (2-4) aufgestellt, der das vermehrte Auftreten von Anticephalin, eines gut charakterisierten lipoidähnlichen Inhibitors mit Antithromboplastin - bzw. Anti-Faktor VIII-Wirkung, als eigentliches pathogenetisches Agens der Hämophilie betrachtete. In der folgenden Zeit ist es immer wieder gelungen, im Bluterplasma einen Inhibitor nachzuweisen, wodurch die Theorie von TOCANTINS eine neue Stütze fand. Erst kürzlich wurde sie von MAMMEN (5) in einer revidierten Fassung erneut bestätigt. Er beobachtete einerseits daß Bluterplasma im Plättchen - Cofaktortest die Thrombinbildung aus gereinigtem Prothrombin inhibierte und konnte andererseits aus ätherextrahiertem Bluterplasma ebensoviel aktiven Plättchen-Cofaktor isolieren wie aus normalem Plasma. Nach seinen Befunden ist dieser Cofaktor mit dem Faktor VIII identisch. Aus Plasmen und Seren von Hämophilen hat MAMMEN einen in seinen physikalischen Eigenschaften näher charakterisierten Hemmkörper isoliert, der gegen das "intrinsic clotting system" gerichtet ist. Er unterscheidet sich eindeutig vom Anticephalin, dem der Autor für die Hämophilie keine Bedeutung beimißt, da er ihn in Bluter- und Normalplasma in gleicher Konzentration nachweisen konnte.

Mit diesen Befunden ist aber die Inhibitortheorie noch nicht bewiesen. Schwierigkeiten bereitet einmal die genetische Deduktion eines pathogenetisch wirksamen Hemmstoffes, zum anderen die in den allermeisten Fällen gegebene Symptomfreiheit heterozygoter Merkmalsträger, der Konduktorinnen, bzw. die Tatsache, daß Bluterplasma in einfachen Mischversuchen mit normalem Plasma im Gegensatz zu dem eindrucksvollen Effekt erworbener zirkulierender Immunohemmkörper, keinerlei Hemmwirkung zeigt.

Gestützt auf die neueren Erkenntnisse der biochemischen Genetik über die Gen-Protein-Beziehungen, äußerten in den letzten Jahren einige Autoren (6-8) die Vermutung, daß die Hämophilie A durch eine molekulare Fehlbildung des Faktors VIII bedingt sein könnte. Ausgehend von der Tatsache, daß

Mutationen der Strukturgene nur die Sequenzen einzelner Aminosäuren in den normalerweise von diesen Genen gebildeten Polypeptidketten verändern, erscheint es möglich, daß das pathologische Gen bei der Hämophilie A die Produktion eines abartigen, funktionell minderwertigen Genproduktes bewirkt. In eindrucksvoller Weise wurden derartige Bildungen falscher Genprodukte z. B. bei den Hämoglobinopathien aufgeklärt, bei denen in einer Polypeptidkette des Hämoglobinmoleküls nur eine einzige Aminosäure durch eine andere ersetzt ist.

Die Anwendung dieser Erkenntnis auf die Hämophilie würde einige klinische und experimentelle Befunde verständlich machen, die mit den anderen beiden Thesen nur schwer zu erklären sind. Neben der weitgehenden Konstanz der Schwere der Erkrankung für einzelne Blutersippen sind dies besonders die gelegentliche Blutungsneigung von Konduktorinnen, die vor allem bei Familien mit leichter Hämophilie A auftritt, sowie die Inhibitoreigenschaften des Bluterplasmas; denn es ist naheliegend, von einem nur wenig abgewandelten Genprodukt anzunehmen, daß es im stöchiometrischen Reaktionsablauf der Vorphase der Blutgerinnung sein normales Homologes bis zu einem gewissen Grade kompetitiv zu hemmen vermag.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die dargelegte These einer Faktor VIII-Fehlbildung durch den immunologischen Nachweis eines Faktor VIII-Proteins im Bluterplasma zu belegen. SHANBERGE und GORE haben schon 1957 ohne Angaben methodischer Einzelheiten kurz berichtet, daß es ihnen gelungen sei, Immunantikörper gegen den Antihämophilen Faktor mit Bluterplasma zu erschöpfen. Sie folgerten daraus, daß Bluterplasma einen Faktor mit ähnlichen antigenen Eigenschaften wie das antihämophile Globulin enthalte. Eine Begründung für die möglichen Interpretationen ihrer Befunde wird nicht gegeben. Ebenso fehlen nähere methodische Angaben und eine Dokumentation der Befunde. Inzwischen haben immunologische Untersuchungen von BERGLUND (10) Zweifel an einem spezifisch gegen Faktor VIII gerichteten Antikörper aufkommen lassen und somit die Grundlage einer immunologischen Faktor VIII - Bestimmung in Frage gestellt. Der Nach-

weis von Faktor VIII-Protein im Bluterplasma ermöglicht noch keine Entscheidung zwischen der MAMMEN'schen Hypothese und der dargelegten These einer molekularen Fehlbildung der Faktor VIII. Deshalb wurde versucht, mittels der im folgenden entwickelten immunologischen Faktor VIII-Bestimmungsmethode zu entscheiden, ob der im ätherbehandelten Bluterplasma gefundene Plättchen-Cofaktor dem normalen Faktor VIII gleichzusetzen ist. Hierbei wurde auf die kritische Arbeit von GRAHAM und BARROW (11) Bezu genommen, die schon 1957 auf Grund experimenteller Befunde an hämophilen Hunden sich intensiv mit dieser Frage auseinandergesetzt haben.

METHODISCHER TEIL

Präparate und Lösungen

1. Antihämophiles Globulin — Behringwerke, lyophilisiert, Ampullen zu 350 mg.
2. Antihämophiles Plasma — "Haemoderivate", lyophilisiert, (Immuno GmbH, Heidelberg, Bergstraße 112)
3. Reinstes Fibrinogen, — hergestellt nach Blombäck, freundlicherweise von Herrn Professor Lüscher, Bern, zur Verfügung gestellt.
4. Antifibrinogenserum — der Behringwerke, abgefüllt in Amp. zu 0,5 ml, Nr. 333
5. Trasylol — reines Trockenpräparat mit 1 Kallikrein-Inaktivator-Einheit (KIE) in 0,3 Gamma, Farbenfabriken Bayer.
6. Aluminiumhydroxyd-Suspension 2% (Behringwerke)
7. m/40 Calciumchloridlösung (Behringwerke)
8. Diäthylbarbitursäure-Puffer p_H 7,6
9. Pufferlösung für die Immunoelektrophorese 20,6 g Veronalnatrium in 1000 ml Aqua dest., davon 770 ml zu 230 ml n/10 HCl; p_H 8,2
10. Pufferlösung für den Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY: 6,98 g Veronalnatrium; 6,0 NaCl; 27,0 ml n/1 HCl gelöst zu 1000 ml Aqua dest.; p_H 7,4

Methoden

Gerinnungsuntersuchungen

Plasma wurde aus Citratblut (9 Teile Venenblut und ein Teil Natriumcitratlösung)durch zweimaliges Zentrifugieren (20 Min. bei 3500 U/Min.) in silikonierten Röhrchen gewonnen. Bis zur Verwendung, die innerhalb der ersten Stunden nach der Blutentnahme erfolgte, wurde das Plasma im Eiswasserbad aufbewahrt, um die spontane Faktor VIII-Inaktivierung auf das Mindestmaß zu beschränken. Das Serum wurde vor seiner Verwendung im Plasmathrombokinasebildungstest zur Inaktivierung überschüssigen Thrombins zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Thrombocyten wurden in silikonierten Röhrchen

aus dem Überstand von 10 Min. bei 1500 U/Min. zentrifugierten Citratplasma gewonnen. Nach dreimaligem Waschen in physiologischer Kochsalzlösung wurden die Thrombocyten in dem der Ausgangsmenge an plättchenreichen Plasma entsprechenden Volumen homogenisiert.

Bluterplasma stand von 4 Patienten (H.N., V.K., P.D. und J.P.) mit Hämophilie A zur Verfügung, die ausgeprägte Gelenkveränderungen und Faktor VIII-Werte unter 1% der Norm aufwiesen. Dagegen hatten diese Patienten normale Konzentrationen an Faktor V, Faktor VII und Prothrombin. In jedem Falle wurde durch Mischversuche mit normalem Plasma des Vorliegen erworbener Antikoagulantien ausgeschlossen.

Der Plasmathrombokinasebildungstest wurde entsprechend der Originalmethode von BIGGS und DOUGLAS (12) durchgeführt. Als Adsorbens wurde 2%-ig Aluminiumhydroxydsuspension verwendet. Die Verdünnungen der Plasmacharg erfolgten mit Veronalpuffer p_H 7,6. Besondere Modifikationen des Tests im Rahmen der Antiserumversuche sind zusammen mit den Ergebnissen im nächsten Abschnitt angegeben.

Die Aetherextraktion des Plasmas wurde nach den Vorschriften von MAMMEN (5) und von GRAHAM und BARROW (11) durchgeführt. Extrahiert wurden frisches Citratplasma und defibriniertes Citratplasma (10 E. Thrombin "LA ROCHE" pro ml Plasma) nach vorausgegangener dreimaliger Adsorption mit Bariumsulfat "MERCK" (je 100 mg/ml Plasma). In einer Versuchsreihe wurden die Plasmaproben dreimal 30 Sekunden, in einer zweiten dreimal 30 Minuten mit gleichen Teilen Aether ausgeschüttelt. Der abgehobene Aetherüberstan wurde jeweils verworfen. Abschließend wurde noch bei Zimmertemperatur vorsichtig Stickstoff aufgeblasen bis der Aethergeruch verschwunden war.

Herstellung von Immunseren gegen Faktor VIII

Die als Antigen verwendeten Präparate Antihämophiles Globulin Behringwerke und Antihämophiles Plasma "Haemoderivate" wurden jeweils kurz vor der Injektion gelöst und zur Entfernung von Prothrombin, Faktor IX und Faktor VII drei Minuten bei 37°C mit 2%-iger Aluminiumhydroxydsuspension adsorbiert.

Mit diesen beiden Antigenpräparationen wurden je 7 Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 3,5 kg nach folgendem Schema immunisiert: An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurden steigende Dosen (0,5; 1,0; 1,5 ml AHG - Behringwerke bzw. 1, 2, 3 ml Antihaemophiles Plasma "Haemoderivate"), intravenös, am 21. Tag nach der ersten Injektion die fünffache Menge der Initialdosis intraperioneal injiziert. Am 28. Tag nach der Erstinjektion wurden die Tiere in Evipannarkose durch Einführen eines Kunststoffkatheters in die freigelegte Aorta abdominalis entblutet. Das gewonnene Vollblut wurde nach Retraktion des Blutkuchens 20 Minuten bei 3400 U/Min. zentrifugiert. Das Rohserum wurde zur Konservierung mit Cialit 1 : 5 000 versetzt und bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor ihrer Verwendung wurden die Seren zur Erhöhung des Antikörpertiters durch Ultrafiltration (Gerät der Membranfilter-Gesellschaft Göttingen) auf eine Konzentration von 12 g % gebracht.

Zu Kontrollzwecken dienten mehrere unter gleichen Bedingungen gewonnene und gelagerte normale Kaninchenseren, die ebenfalls auf 12 g % konzentriert wurden.

Immunoelektrophorese (Methode GRABAR und WILLIAMS) (13)
Verwendet wurde eine Apparatur der Fa. Marggraf, Berlin, in der nebeneinander 5 Glasplatten (14 x 5 cm) angesetzt werden können. Die Schichtdicke des 1 %-igen Elektrophoreseagars betrug 3 mm. Während die Elektrodengefäße mit unverdünnter Pufferlösung gefüllt wurden, erfolgte die Zubereitung der Agarlösung mit einem auf die Hälfte mit Aqua dest. verdünnten Puffer. Die Antigenlösungen wurden zu beiden Seiten des in der Mitte vorgestanzten Grabens in Löchern von 4 mm Durchmesser aufgetragen und danach elektrophoretisch 4 Stunden bei einer Stromstärke von 100 mA und einer Feldstärke von 4 - 5 Volt/cm getrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Platten 30 Min. in ein isotonisches Pufferbad (p_H 7,2) gelegt und im Anschluß daran in den Gräben mit Antiserum beschickt. Die Ablesung und photographische Dokumentation erfolgte in ein bis zwei Tagen.

Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY (14)
In die 3 mm dicke Agarschicht wurden in kreisförmiger Anordnung Löcher von 4 mm Durchmesser gestanzt, die von dem in der Mitte gestanzten Loch einen Abstand von 4 mm hatten. In der Mitte wurde das Antiserum, in der Peripherie die Antigenlösung (0,025 ml) aufgetragen.

Die Papierelektrophorese wurde mit einer Apparatur der Firma Bergmann auf Elektrophoresepapier 214 (Firma Bergmann) mit Veronalpuffer (10,8 g Veronalnatrium in 1000 ml Aqua dest.) durchgeführt. Ausgewertet wurde mit dem Auswertegerät "Fraktograph FB III".

Trägerfreie, präparative Durchflußelektrophorese nach BARROLLIER (15) in der Modifikation von WIEK (16) (Gerät "Pheroplan" der Firma K. Marggraf Berlin 19, Grolmann Straße 44/45). Bei der elektrophoretischen Fraktionierung des Antiserums 258 wurden folgende Versuchsbedingungen eingehalten: Veronalnatrium-Puffer, p_H 8,6, Ionenstärke = 0,025. Klemmenspannung 1800 Volt = 36 Volt/cm, 100 mA. Höhe des Trennspalts 0,5 mm. Pro Stunde wurden 0,8 ml des nativen Rohserums kontinuierlich in die Kammer eingegeben. Die 49 Einzelfraktionen wurden zu 5 Fraktionen zusammengefaßt (siehe Abb. 3 a), und nach Einengung auf einen Proteingehalt von 10 g % (in Veronalpuffer p_H 7,6) getestet.

Die Bestimmung der Eiweißkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen erfolgte mittels der üblichen Biuret-Methode mit dem Reagenz nach WEICHSELBAUM. Die Messung erfolgte in der Makro-Cuvette im Photometer Eppendorf bei der Wellenlänge 546 mu.

ERGEBNISSE

Allgemeine Testung der Antiseren

Um einen Eindruck vom Ansprechen der Tiere auf den Immunisierungsvorgang zu erhalten, wurde vor Beginn und nach Abschluß der Immunisierung durch Gesamteiweißbestimmung und Papierelektrophorese die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Serumproteine der Versuchstiere bestimmt. Bei dem Kaninchen Nr. 258, welches das wirksamste Antiserum lieferte, stieg der Gesamteiweißgehalt von 4,9 auf 7,2 g %, wobei sich der Anteil der gamma-Globuline von 11% auf 28,7% erhöhte.

Eine genauere Bestimmung des Antikörpergehaltes der Antiseren wurde mit dem Doppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY und der Immunoelektrophorese durchgeführt. Beim Austesten des Antiserums im Doppeldiffusionstest gegen eine Verdünnungsreihe von Plasma, Serum oder Antigen zeigte sich eine Vielzahl sich überlagernder Banden, die im Immunoelektropherogramm genauer bestimmt werden konnten. Das Ansprechen der Tiere auf die einzelnen Fraktionen des Antigengemisches war sehr unterschiedlich; das Antikörperspektrum reichte jedoch in den meisten Fällen vom Albumin bis zum beta 2- oder gamma-Globulin. In jeder der beiden Serien bildete nur eines der Tiere ein ausreichend wirksames Antiserum. Das Antiserum Nr. 258 wurde mit dem Antigen "Haemoderivate", das Antiserum Nr. 368 mit dem Antigen der Behringwerke erzeugt. Diese polyvalenten Antiseren zeigten gegen getrenntes Plasma und Serum besonders starke Präpitationslinien im beta-Bereich. Bis auf eine Fibrinogenlinie war in dem Präzipitatbild von Plasma und Serum kein Unterschied festzustellen (Abb. 1, Seite 12).

Da es bisher nicht gelungen ist, den Faktor VIII im Immunoelektropherogramm eindeutig darzustellen, war die Zuordnung einer der Banden zum antihaemophilen Globulin nicht möglich. Das Vorhandensein des spezifischen Antikörpers konnte daher nur durch seine Faktor VIII - neutralisierende Wirkung im Gerinnungstest nachgewiesen werden. Auf den Versuch, die nicht gegen Faktor VIII gerichteten Antikörper der Immunseren durch Vorabsorption mit Serum zu entfernen, mußte verzichtet werden, da dieses die Faktor VIII-Antikörper teilweise

erschöpfte. Die Ausschaltung der unerwünschten Antikörper wurde jedoch durch das gewählte Testsystem sichergestellt.

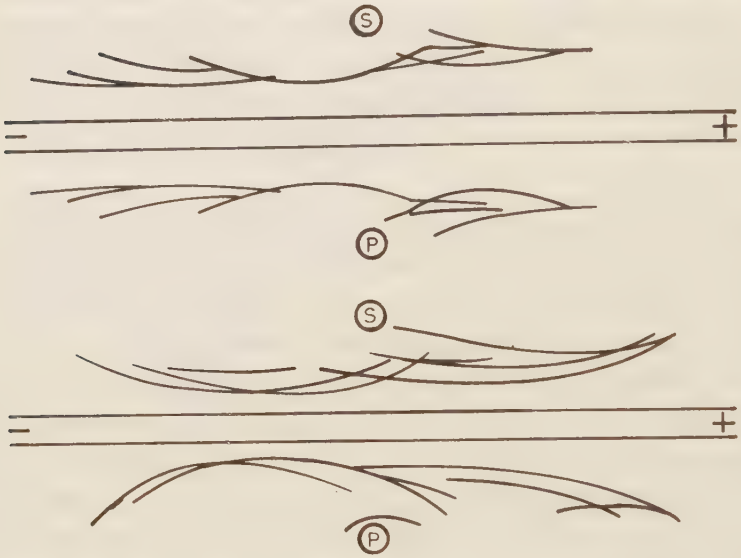


Abb. 1 Immunoelektropherogramm von Plasma (P) und Serum (S), entwickelt mit Antiserum Nr. 258 (oben) bzw. Antiserum 369 (unten).

Der Faktor VIII-Neutralisationstest mit Immunserum und seine Fehlerquellen

Die spezifische Antifaktor VIII-Wirkung der Immunseren wurde im Thrombokinasebildungstest bestimmt, der zur Ausschaltung verschiedener Fehlerquellen in geeigneter Weise modifiziert werden mußte.

Bei den ersten Versuchen wurde unter Beibehaltung der Standardtechnik des Thrombokinasebildungstests das als Faktor VIII-Quelle dienende Aluminiumhydroxyd-adsorbierte Normalplasma anstelle von Pufferlösung mit dem Immun-

serum bzw. mit Kaninchen Normalserum auf die übliche Verdünnungsstufe von 1 : 5 gebracht. Dabei zeigte sich in beiden Ansätzen eine Beschleunigung der Thrombokinasebildung im Vergleich zu einem Kontrollansatz mit Pufferlösung. Dieser Effekt, der auf Serumacceleratoren und Thrombinspuren der nativen Seren zurückzuführen ist, wurde durch einstündige Inkubation mit 2%-iger Aluminiumhydroxydsuspension im Verhältnis 10 : 1 bei 37° ausgeschaltet. Außerdem wurden zur Vermeidung einer Rekalzifizierung in den Antiserum-Plasma-Gemischen die Antiseren zu einem Zehntel ihres Volumens mit 3,8%-iger Citratlösung versetzt. Nach Adsorption an Aluminiumhydroxyd bewirkten die Antiseren im gleichen Testsystem eine starke Verzögerung der Thrombokinasebildung, jedoch wurde diese gegenüber einem Kontrollansatz mit Pufferlösung auch durch die geprüften normalen Kaninchen - und Humanseren deutlich gehemmt. Dieser Effekt, der nur mit unspezifischen Faktoren t zu erklären war, konnte durch Verdünnung des Al-Normalplasma-Antiserumgemisches mit Veronalpuffer auf 1 : 20 vollständig eliminiert werden.

Das Testverfahren erschien in dieser Form dennoch unbefriedigend, da der beobachtete Hemmeffekt der Antiseren mehrere Interpretationen zuließ: eine Inaktivierung des Faktor V oder anderer die Thrombokinasebildung fördernder Faktoren sowohl in der Plasmafraktion als auch in der Serumfraktion des Inkubationsgemisches, da die Immunseren nach einmaliger Absorption mit Al-Normalplasma im OUCHTERLONY-Test noch freie Antikörper aufwiesen. Außerdem werden bei der starken Verdünnung der Plasmacharge die übrigen Gerinnungsfaktoren ebenfalls stark verdünnt, so daß sie in unkontrollierbarer Weise den Hemmeffekt verstärken.

Um diese Fehlerquellen auszuschließen, wurde dem Normalplasma nach der Reaktion mit dem Antiserum Bluterplasma im Überschuß zugesetzt. Auf diese Weise wurden sämtliche vom Antiserum ausgefällten Faktoren mit Ausnahme des Faktors VIII ergänzt, und zugleich die noch vorhandenen freien Antikörper erschöpft. Hiermit waren die Voraussetzungen für den spezifischen immunologischen Faktor VIII-Neutralisationstest geschaffen, der im einzelnen in folgender Weise durchgeführt wurde:

1 Teil Normalplasma wurde mit 4 Teilen Antiserum im Wasserbad von 0° C dreißig Minuten absorbiert. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitats (10 Min bei 3000 U/Min.) wurde 1 Teil des Überstandes mit 3 Teilen Hämophilie A - Plasma 15 Minuten bei 0° C inkubiert, und das Gemisch anschließend 3 Minuten bei 37° C im Verhältnis 10 : 1 mit Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand im Verhältnis 1 : 5 mit Veronalpuffer P_H 7,6 verdünnt. Wie der OUCHTERLONY-Test zeigte, waren in diesem Material alle Antikörper erschöpft. Zur Thrombokinasebildung wurden davon 0,3 ml im Wasserbad bei 37° C mit 0,3 ml Normalserum (1 : 10 mit Veronalpuffer P_H 7,6 verdünnt), 0,3 ml Thrombocytensuspension und nach einer Minute mit 0,3 ml m/40 $CaCl_2$ - Lösung versetzt. Die weitere Durchführung des Testes erfolgte in der üblichen Weise. Es wurden ausschließlich Thrombocyten von Hämophilie - A - Kranken verwendet, da normalen Thrombocyten selbst nach mehrmaligem Waschen noch Faktor VIII anhaftet, der beim Arbeiten in niedrigen Konzentrationsbereichen die Ergebnisse beeinflußt. Desgleichen wurde als Substratplasma stets Bluterplasma verwendet, um besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

In Abb. 2 (Seite 15) sind Befunde dargestellt, die mit diesem Testsystem erhoben wurden. Als Ausdruck der Faktor VIII neutralisierenden Wirkung des Antiserums 258 zeigt sich eine stark verlängerte Gerinnungszeit bzw. eine starke Verminderung und Verzögerung der Thrombokinasebildung im Vergleich zu den Kontrollen. In einem der Kontrollansätze wurde das Antiserum gegen normales Kaninchenserum, in den anderen gegen Veronalpuffer P_H 7,6 ausgetauscht. Um den Inhibitoreffekt des Immunserums quantitativ abschätzen zu können, wurden Pufferkontrollen mit abgestuften Normalplasmakonzentrationen durchgeführt. Dabei wurde die Plasmaverdünnung 1 : 5 gleich 100% gesetzt, 1 : 20 gleich 25% usw. Aus der Abbildung wird dadurch deutlich, daß das Antiserum etwa 90 % der normalen Faktor VIII Menge unwirksam gemacht hat.

Um den erhaltenen Inhibitoreffekt des Antiserums als spezifische Antifaktor VIII-Wirkung zu beweisen, wurde noch folgender Kontrollversuch durchgeführt: 1 Teil des Antiserums wurde zuerst mit 3 Teilen Bluterplasma inkubiert und

nach Abzentrifugieren wurden 3 Teile des Überstandes mit einem Teil 1 : 5 (mit Veronalpuffer) verdünntem Normalplasma für 30 Minuten bei 0° C inkubiert. Nach erfolgter $Al(OH)_3$ - Adsorption wurde das Gemisch 1 : 5 mit Veronalpuffer verdünnt und in der üblichen Weise getestet. Ebenso wie in einem Parallelansatz mit normalem Kaninchenserum war die Thrombokinasebildung, gemessen an einer Kontrolle mit Pufferlösung nicht verzögert. Damit war gezeigt, daß das untersuchte Immunserum außer Faktor VIII keine anderen thromboplastischen Faktoren inaktivierte.

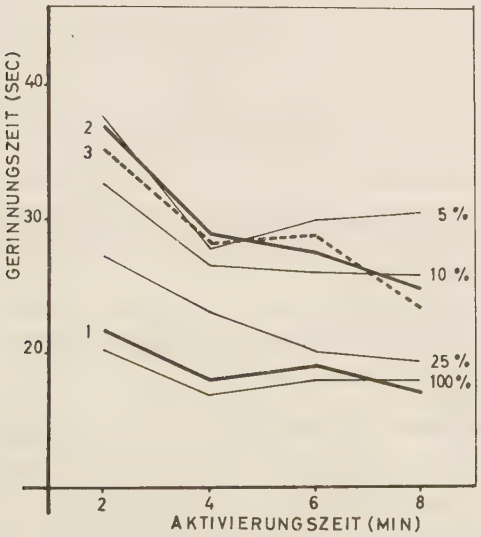


Abb. 2 Faktor VIII-Neutralisationstest mit spezifischem Antiserum. Thrombokinasebildung nach Behandlung der Normalplasmacharge mit normalem Kaninchenserum (1), mit Antiserum Nr. 258 (2), mit Antiserum Nr. 258 nach Absorption mit Fibrinogen (3). (Weitere Erläuterungen im Text).

Die im Faktor VIII-Neutralisationstest erfaßte spezifische Anti-Faktor VIII-Aktivität der Immunseren war hiermit noch nicht als Antikörperwirkung bewiesen. Es galt vor allem, eine fermentative Zerstörung des Faktor VIII auszuschließen, wie sie vor allem für das Plasmin (17) bekannt ist. Dies gelang mit zwei voneinander unabhängigen Methoden. Einmal wurde die Hemmwirkung des Immunserums in Gegenwart von Trasylol untersucht, welches dem Reaktionsgemisch von Antiserum und Normalplasma in einer Konzentration von 250 K.I.E./ml zugesetzt wurde. Hierbei zeigte das Antiserum die gleiche inhibitorische Wirkung wie in einem entsprechenden Ansatz ohne Trasylol. Mit einer zweiten Methode konnte ebenfalls das Vorliegen einer fibrinolytischen Aktivität im Antiserum-Plasmagemisch ausgeschlossen werden: 4 Teile Immunserum wurden mit einem Teil Normalplasma 3 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit Thrombin defibriniert, und der Überstand im OUCHTERLONY-Test auf Fibrinolyseprodukte untersucht. Als Antiserum diente hierzu ein monospezifisches Antifibrinogenserum, welches auch Fibrinogenspaltprodukte präzipitiert (18). Der Test fiel bei wiederholten Kontrollen stets negativ aus, so daß eine Faktor VIII Zerstörung durch Plasmin nicht in Betracht kam.

Gegen eine Fermentwirkung sprach weiterhin die Temperaturunabhängigkeit der inhibitorischen Wirkung der Antiseren. Nach halbstündiger Inkubation bei 0° und bei 25° zeigte sich ein gleich starker Effekt.

Zur weiteren Untersuchung über das Wesen der Anti-Faktor VIII-Aktivität wurde das Antiserum 258 mittels trägerfreier präparativer Durchlaßelektrophorese (16) in 49 Einzelfraktionen aufgetrennt. Die isolierten Fraktionen wurden in der aus Abb. 3a ersichtlichen Weise zusammengefaßt und untersucht. Wie Abb. 3b erkennen läßt, wurde die gesamte Hemmwirkung ausschließlich in der Gamma-Globulin-Fraktion gefunden (s. Seite 17). Dies war eine weitere Stütze für die Annahme eines spezifischen Faktor VIII-Antikörpers.

Da die Immunseren nach dem immunoelektrophoretischen Befund auch Antikörper gegen Fibrinogen enthielten, mußte auf Grund der bekannten engen As-

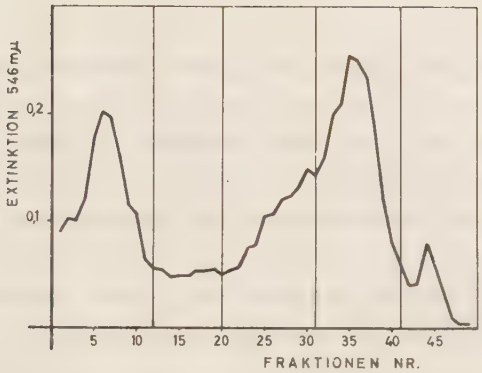
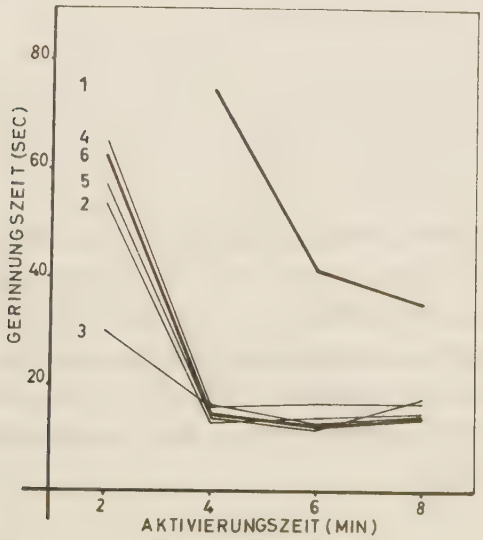


Abb. 3a Messung der Anti-Faktor VIII Aktivität der isolierten Antiserumfraktionen. Präparative Trennung des Antiserums Nr. 258 mittels trägerfreier Durchflußelektrophorese (s. method. Teil) in folgende Sammelfraktionen: 1 Fraktion 1-12 (Gamma-Glob.) 2 Fraktion 13-20 (Beta-Glob.) 3 Fraktion 21-31 (Alpha-Glob. +Albumin) 4 Fraktion 32-41 (Albumin) 5 Fraktion 32-49 (Präalbumin)

Abb. 3b (unten) Testung der Sammelfraktionen 1-5 im Faktor VIII-Neutralisationstest. 6 Pufferkontrolle.



soziation von Faktor VIII und Fibrinogen (19) die Frage einer Ko-Präzipitation besonders untersucht werden. Wie die Kurve 3 in Abb. 2 zeigt, blieb die Hemmwirkung der Immunseren nach Vorabsorption mit reinstem Humanfibrinogen, das im Gegensatz zu anderen käuflichen Fibrinogenpräparationen keinerlei Faktor VIII-Aktivität zeigte, unvermindert erhalten. Dieser Befund wurde unterstützt durch die Tatsache, daß eine Reihe von Immunseren mit deutlicher Fibrinogenbande im Immunoelektropherogramm keine Anti-Faktor VIII Aktivität besaßen. Somit konnte eine Ko-Präzipitation von Faktor VIII und Fibrinogen ausgeschlossen werden.

Der Nachweis von Faktor VIII Protein im Bluterplasma

Nachdem die Spezifität des immunologischen Faktor VIII-Neutralisationstestes gesichert war, konnten Faktor VIII Bestimmungen in Normalplasma, Bluterplasma sowie Bluter- und Normalserum durchgeführt werden. Hierzu war lediglich erforderlich, das Antiserum mit dem auf seinen Faktor VIII-Gehalt zu prüfenden Material vorzuabsorbieren, und die verbliebene Anti-Faktor VIII-Aktivität mit Hilfe des Faktor VIII-Neutralisationstestes zu bestimmen. Folgendes Ansatzschema wurde eingehalten: 4 Teile Al-Antiserum wurden mit einem Teil des zu untersuchenden Plasmas oder Serums zur Vorabsorption 60 Minuten bei 0° C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitates wurden 4 Teile des Überstandes mit einem Teil Normalplasma, das für sämtliche Untersuchungen vom gleichen Spender stammte, zusammengegeben und für weitere 30 Minuten bei 0° C im Wasserbad belassen. Nach scharfem Abzentrifugieren der geringen Präzipitatmenge, die sich jetzt noch bildete, wurde ein Teil des Überstandes mit 3 Teilen Blutplasma 15 Minuten bei 0°C inkubiert, wobei es nicht mehr zu einer Niederschlagsbildung kam. Nach Verdünnung im Verhältnis 1 : 5 mit Veronalpuffer P_H 7,6 wurde das Gemisch in den Ansatz zur Thrombokinasebildung gegeben. Die geringe Verdünnung des Antiserums bei der Vorabsorption wurde in den Kontrollen mit nicht vorabsorbierten Antiseren durch entsprechenden Zusatz von Veronalpuffer kompensiert.

Die Vorabsorption der Antiseren mit Plasma von Normalen und Hämophilie A-Kranken bewirkte eine starke Verminderung der inhibitorischen Wirkung der Antiseren. Um diesen Effekt quantitativ beurteilen zu können, wurde die Vorabsorption mit stufenweise verdünntem Normalplasma durchgeführt. In Abb. 4 ist das Ergebnis eines Versuches dieser Art wiedergegeben: die Antikörper werden entsprechend der steigenden Plasmakonzentration bei der Vorabsorption in zunehmendem Maße erschöpft, wodurch der inhibitorische Effekt des Immunserums schrittweise abfällt. Die weiteren drei in diesen Versuch einbezogenen Plasmen ließen sich dadurch genauer beurteilen: die beiden Hämophilie A - Plasmen hemmten das Antiserum in gleichem Maße wie ein zweites Normalplasma und zwar etwa halb so stark wie das für die Verdünnungsreihe verwendete Normalplasma.

Die hier schon deutlich werdende Streubreite der Faktor VIII-Konzentration wird besonders in Abb. 5 erkennbar: es zeigt sich, daß bereits Normalplasmen verschiedener Spender in unterschiedlichem Ausmaß Faktor VIII-Antikörper neutralisieren. Somit besteht Übereinstimmung mit der aus Gerinnungsuntersuchungen bekannten großen Streubreite der Faktor VIII-Konzentration (20). Die beiden in dieser Versuchsreihe getesteten Hämophilie A-Plasmen liegen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bindung der Faktor VIII-Antikörper des Immunserums durchaus im normalen Bereich. Hieraus folgt, daß auch im Bluterplasma Faktor VIII-Protein in annähernd normaler Konzentration vorhanden ist.

Einen auffallenden Unterschied zu den Plasmen zeigten die Seren: Normalserum und Hämophilie A-Serum reduziert die Hemmwirkung der Antiseren in deutlich geringerem Maße als die entsprechenden Plasmen.

Dieser Befund läßt zwei Erklärungsmöglichkeiten zu: die geringere Absorptionsrate könnte einmal auf einem verminderten Faktor VIII-Gehalt, zum anderen aber auf einer qualitativen Veränderung des Faktor VIII beim Gerinnungsablauf beruhen.

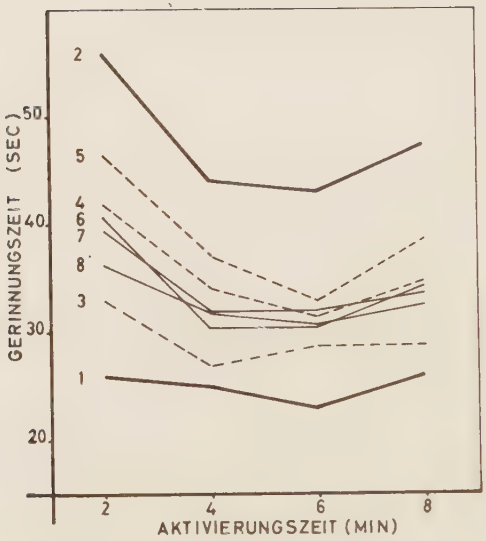


Abb. 4 Faktor VIII Nachweis im Normalplasma und Bluterplasma durch Vorabsorption des Anti-Faktor VIII Immunserums. Faktor VIII Neutralisationstest mit Puffer anstelle von Antiserum (1), mit Antiserum Nr. 368 nach Vorabsorption mit Normalplasma M.S., in den Konzentrationen 100% (3), 50% (4), 25% (5), mit Antiserum Nr. 368 ohne Vorabsorption (2), nach Vorabsorption mit Bluterplasma V.K. (6), mit Bluterplasma I.P. (7) und Normalplasma W.P. (8). Weitere Erläuterungen im Text.

Untersuchungen über die Faktor VIII-Aktivität in ätherbehandeltem Normal- und Bluterplasma.

Nach den Beobachtungen verschiedener Autoren (4, 5, 21) tritt im Bluterplasma nach Ausschütteln mit Äther eine Substanz auf, die im Plättchen-Cofaktor-Test und im Thrombokinasebildungstest die Gerinnung von Hämophilie A-Plasma zu normalisieren vermag. Wie im einleitenden Abschnitt aus-

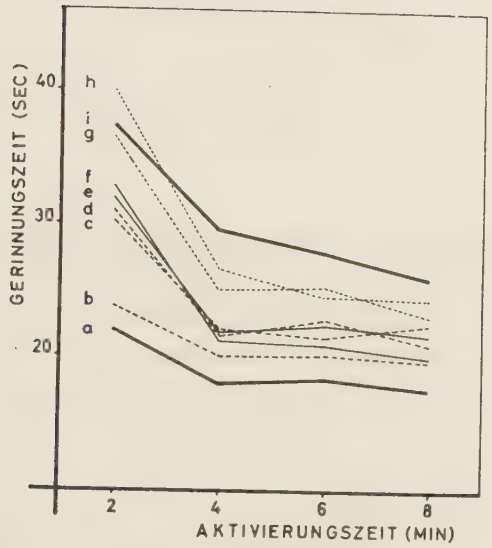


Abb. 5 Immunologischer Faktor VIII Nachweis im Plasma und Serum von Blutern und Normalpersonen. Faktor VIII-Neutralisationstest mit normalem Kaninchenserum anstelle von Antiserum (a), mit unbehandeltem Antiserum Nr. 258 (i), mit Antiserum Nr. 258 nach Vorabsorption mit Normalplasma M.S. (b), Normalplasma G.A. (c), Normalplasma G.B. (d), Bluterplasma H.N. (e), Bluterplasma P.D. (f), Normalserum G.B. (g) und Bluterserum H.N. (h).

geführt, wird dieser Effekt in dem Sinne interpretiert, daß die Ätherein-wirkung einen Inhibitor zerstört und so den ursprünglich gehemmten Faktor VIII wirksam werden läßt. In klarem Widerspruch dazu haben GRAHAM und BARROW gefunden, daß Faktor VIII in normalem Plasma durch Äther zerstört wird. Bei der gegebenen Möglichkeit einer immunologischen Faktor VIII-Bestimmung war es naheliegend zu prüfen, ob die im Bluterplasma durch Ätheinwirkung zu aktivierende Substanz mit Faktor VIII identisch ist, und durch das Anti-Faktor VIII-Serum neutralisiert wird.

Bei der Ätherextraktion von Bluterplasma wurden sowohl die Vorschriften von GRAHAM und BARROW, als auch diejenigen von MAMMEN eingehalten. Die Ausführung der geplanten Untersuchung scheiterte jedoch daran, daß es in keinem Fall gelang, durch Ätherextraktion eine genügend große Faktor VIII ähnliche Aktivität in Hämophilie A-Plasma zu erzeugen. Darüber hinaus zeigte sich, daß normales Plasma durch Ätherbehandlung seine Faktor VIII-Aktivität vollständig verliert.

Bluter- und Normalplasma wurden einmal in nativer Form, zum anderen nach Defibrinierung mit Thrombin und nachfolgender $BaSO_4$-Adsorption mit Äther extrahiert. Die Faktor VIII-Aktivität wurde im Thrombokinasebildungstest bestimmt. In einer ersten Versuchsreihe wurde ein Teil ätherbehandeltes Plasma (1 : 5 mit Veronalpuffer verdünnt) mit 3 Teilen Al-Bluterplasma gemischt. Nach weiterem Verdünnen auf 1 : 5 mit Veronalpuffer wurde dieses Gemisch (0,3 ml) zur Thrombokinasebildung mit 1 : 10 verdünntem Normalserum (0,3 ml), Hämophilie A-Thrombocytensuspension (0,3 ml) und m/40 $CaCl_2$-Lösung (0,3 ml) inkubiert und in der üblichen Weise getestet. Zur Gewinnung von Bezugswerten wurden die ätherbehandelten Plasmen durch Verdünnungen von Al-Normalplasma bzw. durch Pufferlösung ersetzt. Die Befunde sind in Abb. 5 dargestellt. Sie zeigen, daß natives Bluter- und Normalplasma nach Ätherbehandlung die gestörte Thrombokinasebildung geringfügig beschleunigte (Kurve 3-6). Doch wie der Vergleichswert (Kurve 9) zeigt, entsprach dieser Effekt nicht einmal 5% der ursprünglich im Normalplasma vorhandenen Faktor VIII-Aktivität. Auch in einem zweiten Testsystem, in welchem als Quelle der plasmatischen Bestandteile ein 1 : 1 Gemisch aus Al-Bluterplasma und den verschiedenen ätherextrahierten Plasmen verwendet wurde, war die Beschleunigung der Thrombokinasebildung nur wenig größer. Wurde die Ätherextraktion nur 3 mal 30 Sekunden durchgeführt anstatt 3 mal 30 Minuten, so war die thromboplastische Aktivität noch geringer. Es bestand kein Unterschied zwischen den nativen und den defibrinierten ätherextrahierten Bluter- und Normalplasmen. Wurden die ätherbehandelten Plasmen mit Aluminiumhydroxydsuspension im Verhältnis 10 : 1 adsorbiert, so verschwand der geringe thromboplastische Effekt vollständig (siehe Kurven 7a, b und 8a,

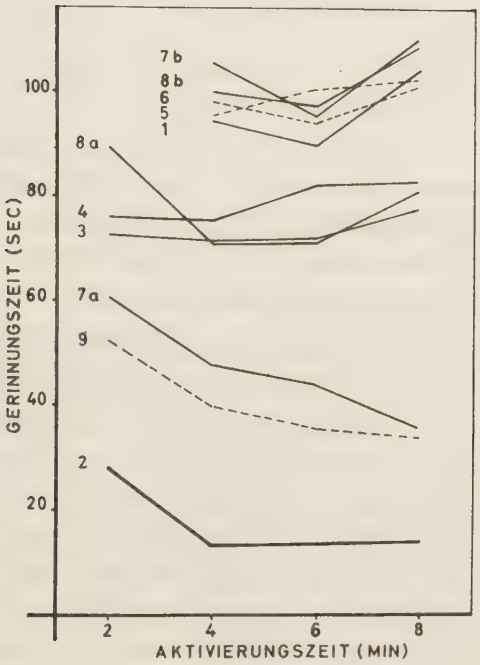


Abb. 6 Thrombokinasebildungstest mit ätherbehandeltem Bluter- und Normalplasma.
1. Versuchsreihe: Als Faktor V- und Faktor VIII-Quelle dienten Gemische (1:5 mit Puffer P_H 7,6 verd.) aus 3 Teilen Al $(OH)_3$ adsorbiertem Bluterplasma und je ein Teil
(1) Pufferlösung P_H 7,6
(2) Normalpl. 1:5 verd. = 100% Faktor VIII-Aktivität
(9) Normalpl. 1:100 verd. = 5% Faktor VIII-Aktivität
(3) Bluterpl. (3x30 Min. extr.) 1:5 verd.
(4) Normalpl. (3x30 Min. extr.) 1:5 verd.
(5) defibr. Bluterpl. (3x30 Min. extr.) 1:5 verd.
(6) defibr. Normalpl. (3x30 Min. extr.) 1:5 verd.
2. Versuchsreihe: Als Faktor V- und Faktor VIII-Quelle dienten Gemische aus 1 Teil Al $(OH)_3$ adsorbiertem Bluterplasma und je ein Teil
(7a) Bluterpl. (3x30 Min. extr.) unverd.
(7b) Bluterpl. (3x30 Min. extr. u. Al$(OH)_3$ adsorb.) unverd.
(8a) Normalpl. (3x30 Min. extr.) unverd.
(8b) Normalpl. (3x30 Min. extr. u. Al $(OH)_3$ adsorb.) unverd.
Weitere Erläuterungen im Text.

b in Abb. 5). Damit ist erwiesen, daß er nicht durch Faktor VIII bedingt war.

BESPRECHUNG

Die entscheidende Voraussetzung für den immunologischen Nachweis von Faktor VIII - Protein im Bluterplasma bildeten die Gewinnung eines genügend starken Anti-Faktor VIII-Serums und der Nachweis einer spezifischen Antikörperwirkung in einem geeigneten Neutralisationstest.

Angeregt durch das Krankheitsbild der Hemmkörperhämophilie, haben RICHARDS und SPAET (22) als erste die antigenen Eigenschaften von Faktor VIII untersucht. Sie injizierten Kaninchen eine Faktor VIII-angereicherte Plasmafraktion und untersuchten die Wirkung des gewonnenen Immunserums im Thrombokinasebildungstest, indem sie es anstelle von physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel für die $BaSO_4$-adsorbierte Plasmacharge verwendeten. Die hierdurch bewirkte Hemmung der Thrombokinasebildung wurde von den Autoren als Faktor VIII-spezifischer Effekt gewertet, da ein mit dem Antiserum vorbehandeltes Normalplasma den Prothrombinverbrauch von Hämophilie A-Plasma deutlich weniger steigerte als in nativem Zustand.

Dieser Befund und seine Deutung wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von BERGLUND (10) in Frage gestellt. Auf Grund des experimentellen Nachweises, daß Immunseren gegen Plasmathrombokinase, Prothrombin, Fibrinogen und Serum unter den Versuchsbedingungen von RICHARDS und SPAET (22) die Thrombokinasebildung in beträchtlichem Maße hemmen, wird eine Faktor VIII spezifische Wirkung solcher Immunseren bezweifelt. Insbesondere wird darauf hingewiesen, daß das Antiserum gegen Faktor VIII auch Antikörper gegen Fibrinogen enthielt. Da es die Thrombokinasebildung nur schwach und in etwa gleichem Maße wie ein Antifibrinogenserum inhibierte, diskutiert die Autorin die Möglichkeit, daß der inhibitorische Effekt beider Antiseren durch eine Reaktion mit dem Fibrinogen des Substratplasmas vorgetäuscht wurde. Die Erschöpfung der inhibitorischen Wirkung der Antiseren durch Bluter- od

Normalplasma könnte demnach auf einer Erschöpfung der Fibrinogen-Antikörper beruhen.

Diese Einwände gegen die Spezifität von Anti-Faktor VIII-Seren konnten in den hier vorliegenden Untersuchungen ausgeschlossen werden. Der Nachweis der Spezifität ist nur dann schwierig, wenn man die Antiseren, wie es BERGLUND (10) und zunächst auch RICHARDS und SPAET (22) getan haben, unverdünnt in den Thrombokinasebildungsansatz hineingibt. Hierbei bewirken auch normale Kaninchenseren, und in gleicher Weise Humanseren, deutliche Hemmeffekte. Da diese durch Verdünnung beseitigt werden konnten, sind sie zweifellos auf unspezifische Faktoren zurückzuführen. Mit dem im vorigen Abschnitt beschriebenen Testsystem, bei dem substituiertes Bluterplasma als Faktor VIII-Quelle benutzt wurde, konnten einwandfreie und gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Das Testsystem gewährleistete den eindeutigen Nachweis, daß die wirksamen Immunseren denjenigen Faktor des Normalplasmas hemmten, der den Defekt des Hämophilie A-Plasmas ausgleicht. Daß es sich bei dieser Hemmwirkung um die Wirkung Faktor VIII-neutralisierender Antikörper handelte, wurde auf Grund folgender Beobachtungen als erwiesen betrachtet: der Inhibitoreffekt war auf die Gamma-Globulinfraktion der Antiseren beschränkt; er war stufenweise erschöpfbar und temperaturunabhängig; eine fibrinolytische Zerstörung und eine Kopräzipitation durch Fibrinogenantikörper konnte ausgeschlossen werden.

Nachdem die Spezifität des Faktor VIII-Neutralisationstests sichergestellt war, konnten immunologische Faktor VIII-Bestimmungen durchgeführt werden. Die Absorptionsversuche zeigten, daß Bluter- und Normalplasma die Antikörper etwa gleich stark erschöpften. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß Hämophilie A-Plasma ein Protein enthält, welches in seiner Antigenstruktur weitgehend dem Faktor VIII entspricht, und größenordnungsmäßig in der gleichen Konzentration vorliegt wie der Faktor VIII im Normalplasma.

Dieser Befund stimmt mit den Angaben von SHANBERGE und GORE (9) überein. In der kurzen Mitteilung, die keine genaueren methodischen Angaben enthält, äußern die Autoren u.a. die Vermutung, daß es sich bei dem von ihnen nachgewiesenen Faktor um eine inaktive Vorstufe von Faktor VIII handelt, der

zu seiner Aktivierung eines Faktors bedarf, der nur in normalem Plasma enthalten ist. Diese Interpretation lassen die hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse nicht zu, da die vom Bluterplasma adsorbierten Antikörper des Immunserums eindeutig gegen den Faktor gerichtet waren, dessen Aktivität im Bluterplasma gestört ist. Die fehlende biologische Wirksamkeit der Antikörper-bindenden Substanz im Hämophilie A-Plasma läßt nur zwei Interpretationen zu: entweder handelt es sich um normalen Faktor VIII, der durch einen Inhibitor blockiert ist, oder es liegt ein funktionell minderwertiges Genprodukt mit normalen Antigendeterminanten vor.

Grundlage der Hypothese, daß der Faktor VIII bei der Hämophilie A durch ein Inhibitor blockiert ist, bildet vor allem die Beobachtung, daß durch Ätherextraktion von Bluterplasma eine thromboplastische Substanz aktiviert wird (2-5 Umstritten ist die Frage, ob es berechtigt ist, diesen Accelerator mit Faktor VIII gleichzusetzen. Nach MAMMEN (5) ist die im ätherbehandelten Bluterplasma entstandene Plättchen-Cofaktor-Aktivität mit Faktor VIII identisch; er findet aber auch in normalem Plasma nach Ätherextraktion eine starke Zunahme der Plättchen-Cofaktor-Aktivität. Dagegen konnten GRAHAM und BARROW (11) mit Hilfe des Thrombokinasebildungstests zeigen, daß normales Plasma nach Ausschütteln mit Äther seine Faktor VIII-Wirkung weitgehend verliert. Der geringe thromboplastische Effekt, den sie im ätherextrahierten Bluterplasmas beobachten konnten, verschwand nach Bariumsulfatadsorption, wodurch er sich eindeutig von einer Faktor VIII-Aktivität unterschied. Auf Grund dieses Widerspruches wurden hier die von GRAHAM und BARROW (11) an hämophilen Hunden erhobenen Befunde bei menschlichen Blutern nachgeprüft. Wie im vorigen Abschnitt ausgeführt, wurde ebenfalls gefunden, daß ätherbehandeltes Bluter- und Normalplasma keine Faktor VIII-Aktivität zeigt. Die geringe thromboplastische Wirkung war an Aluminiumhydroxyd adsorbierbar.

Die Mehrzahl der Befunde von MAMMEN (5) wurde im Plättchen-Cofaktortest erhoben. Mit Hilfe dieses Testsystems konnte er zeigen, daß der aus ätherbehandeltem Bluter- und Normalplasma gewonnene Plättchen-Cofaktor nicht von $BaSO_4$ adsorbiert wird. Nach Angabe des Autors bewirkte das gereinigte Plättchen-Cofaktor-Material zwar auch im Thrombokinasebildungstest eine thromb

plastische Wirkung, doch fehlt hier der Nachweis, daß dieser Effekt auch nach $BaSO_4$-Adsorption noch vorhanden war. Die Befunde lassen daran denken, daß es sich bei dem im Plättchen-Cofaktortest und dem im Thrombokinasebildungstest aktiven Faktor um zwei verschiedene Substanzen handelt, die beide durch Äther aktiviert werden, sich jedoch auf Grund der Adsorbierbarkeit an $BaSO_4$ bzw. $Al(OH)_3$ unterscheiden. Es erscheint jedoch nicht gerechtfertigt, eine solche Substanz einem reaktivierten Faktor VIII gleichzusetzen, da der im Thrombokinasebildungstest wirksame Accelerator des ätherbehandelten Bluterplasmas von Bariumsulfat und Aluminiumhydroxyd adsorbiert wird.

Abgesehen von den Einwänden, die sich auf Grund der Ergebnisse von Gerinnungsuntersuchungen gegen die Inhibitor-These ergeben, hält sie auch einer genetischen Betrachtung nicht stand. Würde nämlich durch das Hämophilie-Gen ein Inhibitor induziert werden, so müßten auch die heterozygoten Merkmalsträger, die ja neben dem normalen Gen ein Hämophilie-Gen besitzen, Gerinnungsstörungen aufweisen. Dies ist jedoch, wenn man einmal von den Komplikationen bei Konduktorinnen, die eine leichte Hämophilie übertragen, absieht, nicht der Fall. Als rezessives Erbleiden hat die Hämophilie A vielmehr den Charakter einer Defektkrankheit. Nach den neueren Erkenntnissen der biochemischen Genetik über die Gen-Protein-Beziehungen bedeutet dies allerdings nicht, daß das für die Faktor VIII-Synthese zuständige Gen stumm geworden ist. Vielmehr ist zu erwarten, daß das mutierte Faktor VIII-Gen zu abgewandelten Genprodukten führt.

Über die mutationsbedingte Fehlbildung von Wirkstoffen hat vor allem die Bakteriengenetik Aufschluß gebracht. Am besten untersucht ist hier das Beispiel der Tryptophansythetase von E. coli (23, 24) und N. crassa (25, 26). Bei der Mehrzahl der Tryptophanmangelmutanten dieser Mikroorganismen fand man inaktives oder vermindert aktives Enzymprotein, das mit Immunseren gegen normale Tryptophansynthetase eine Kreuzreaktion ergab, und deshalb als kreuzreagierendes Material (CRM) bezeichnet wurde. Die nähere Analyse der CRM-Proteine der verschiedenen Mangelmutanten zeigte, daß sie sich in ihrer chemischen Zusammensetzung, ihrer Affinität zu den Tryptophansynthetase-Antikörpern und in ihrer verbliebenen Enzymaktivität unterschieden. Daraus

geht hervor, daß im Bereich des Genlocus für ein einziges Enzymsystem verschiedene umschriebene Mutationen möglich sind, die zu unterschiedlich abgewandelten Genprodukten führen.

Hinweise auf das Vorkommen CRM - analoger Proteine im menschlichen Plasma finden sich auch bei anderen Defektkrankheiten. Hier sei auf die Befunde von FANTL, SAWERS und MARR (27) verwiesen. Bei einem Hämophilie B-Kranken, dessen Gerinnungsstörung mit Hemmkörperhämophilie kompliziert war, konnten die Autoren folgende Beobachtung machen: der Immunohemmkörper konnte an Faktor IX beladenes $BaSO_4$ adsorbiert werden, das durch $BaSO_4$-Adsorption von Normalplasma gewonnen worden war. Erfolgte die Vorbehandlung des Adsorbens mit dem Plasma von Hämophilie B-Kranken, so war in einem Teil der Fälle ebenfalls eine Bindung des Antikoagulans möglich, bei anderen Fällen hingegen nicht. Dieser Befund zeigt, daß der abgewandelte Faktor IX bei verschiedenen Patienten noch immunologisch wirksam ist, in einem anderen Teil der Fälle jedoch keine Affinität mehr zu den Antikörpern besitzt oder vollkommen fehlt.

Die Existenz eines Faktor VIII-ähnlichen Proteins im Bluterplasma wirft die Frage auf, wie es unter diesen Umständen bei transfundierten Bluterkranken zur Bildung stark wirksamer Faktor VIII-Hemmkörper kommen kann, die vielfach auf einen Immunisierungsprozeß zurückgeführt wurden (28). Solche Hemmkörper sind jedoch auch bei Patienten ohne Hämophilie beschrieben worden (28). Es ist auch darauf hinzuweisen, daß BRECKENRIDGE und RATNOFF (29) in neueren Untersuchungen eine Antikörperwirkung für das Zustandekommen dieses Krankheitsbildes in Frage gestellt haben. Es wäre jedoch denkbar, daß das Antihämophile Globulin wie z.B. das Fibrinogen (30) und das Albumin (31) mehrere voneinander unabhängige Antigendeterminanten besitzt, die nicht bei allen abnormen Genprodukten vorhanden sind. Damit wären die Voraussetzungen zu einer Immunisierung bestimmter Hämophilie A-Patienten gegen Faktor VIII gegeben.

Die für einzelne Blutersippen unterschiedlichen Schweregrade der Hämophilie A weisen darauf hin, daß an dem für die Faktor VIII-Synthese zuständigen Genlocus des X-Chromosoms verschiedenartige Mutationen auftreten können, wo

durch Genprodukte unterschiedlicher Faktor VIII-Aktivität gebildet werden. Da die abnormen Genprodukte aller Wahrscheinlichkeit nach auch von den Konduktorinnen gebildet werden, ist zu erwarten, daß sie mit zunehmender chemischen Ähnlichkeit mit dem normalen Faktor VIII im Plasma konkurrieren. Hierzu würde die bekannte Tatsache passen, daß die Faktor VIII-Aktivität bei Konduktorinnen, die eine leichte Hämophilie übertragen, gewöhnlich niedriger ist als bei den Überträgerinnen einer schweren Hämophilie (32).

Eine Gleichsetzung des im Bluterplasma gefundenen Faktor VIII-Antigens mit dem CRM-analogen Genprodukt eines mutierten Faktor VIII-Gens erscheint vor allem deswegen berechtigt, weil mit dieser Deutung die verminderte Faktor VIII-Aktivität und gewisse Inhibitor-Eigenschaften des Bluterplasma am leichtesten auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen sind. Da es in vitro mit kleinen Mengen Normalplasmas gelingt, den Gerinnungsdefekt des Bluterplasmas zu normalisieren, darf man allerdings annehmen, daß der abgewandelte gegenüber dem normalen Faktor VIII eine deutlich geringere Affinität zu dem physiologischen Reaktionspartner besitzt. Der von MAMMEN (5) im Plättchen-Cofaktortest nachgewiesene Hemmeffekt des nativen Bluterplasmas beruht nach den Untersuchungen des Autors auf der Anwesenheit eines von ihm näher charakterisierten Inhibitors: dieser wird nicht von $BaSO_4$ adsorbiert, wird durch Äthereinwirkung zerstört und ist thermolabil. Es muß auffallen, daß diese Eigenschaften weitgehend mit denen des Faktor VIII übereinstimmen. Hierin wird eine weitere Stütze für die Richtigkeit der hier vertretenen Auffassung gesehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Immunisierung von Kaninchen wurden Antiseren gegen humanen Faktor VIII gewonnen, deren spezifische Anti-Faktor VIII-Wirkung mit einem modifizierten Thrombokinasebildungstest (Faktor VIII-Neutralisationstest) nachgewiesen werden konnte.

Die gegen den Faktor VIII gerichteten Antikörper der Immunseren ließen sich in gleichem Maße mit Normalplasma und Bluterplasma absorbieren, woraus sich ergibt, daß im Bluterplasma etwa ebensoviel Faktor VIII-Protein enthalten ist wie im normalen Plasma. Im Normalserum und Bluterserum wurden mit dieser Methode deutlich geringere und ebenfalls annähernd gleiche Faktor VIII Konzentrationen gefunden.

Es wird die Auffassung vertreten, daß es sich bei dem im Bluterplasma vorhandenen Faktor VIII-Protein - in Analogie zu den kreuzreagierenden Substanzen (CRM) bei Bakterien - Mangelmutanten - um das Produkt einer genetisch bedingten Faktor VIII-Fehlsynthese handelt, welches funktionell minderwertig ist in seinen Antigendeterminanten jedoch weitgehend mit normalem Faktor VIII übereinstimmt. Hiermit werden gewisse Inhibitoreigenschaften des Bluterplasmas sowie verschiedene andere klinische Erfahrungen und experimentelle Befunde erklärt.

Die These verschiedener Autoren, daß Bluterplasma den Faktor VIII in normaler Quantität und Qualität enthalte, und daß ein gegen ihn gerichteter Inhibitor das pathogenetische Agens der Hämophilie A darstellt, wird abgelehnt. Der Widerspruch wird mit genetischen Überlegungen und der Beobachtung begründet daß der im Bluterplasma nach Ätherbehandlung auftretende Accelerator nicht mit Faktor VIII identisch ist.

LITERATUR

(1) BIGGS, R.: Inhibitors in hemophilia. "Progress in coagulation". Schattauer, Stuttgart, 1962, p. 91

(2) TOCANTINS, L.M.: Antithromboplastic activity of normal and hemophilic plasmas. Fed. Proc. 1:85 (1942)

(3) TOCANTINS, L.M.: Hemophilic syndromes and hemophilia Blood 9:281 (1954)

(4) TOCANTINS, L.M.: Discussion to inhibitors in hemophilia. "Progress in coagulation". Schattauer, Stuttgart, 1962, p. 100

(5) MAMMEN, E.: Investigations on the nature of hemophilia A. Thrombos. Diathes. haemorrh. 9:30 (1963)

(6) GITLIN, D, and C.A. JANEWAY: Genetic alterations in plasma proteins of man. "The plasma proteins", edit. F.W. PUTNAM, Bd. II, p. 407 Acad. Press, New York, 1960

(7) LENZ, W.: Medizinische Genetik, Thieme, Stuttgart, 1961

(8) SURGENOR, D.: Discussion to inhibitors in hemophilia. "Progress in coagulation". Schattauer, Stuttgart, 1962, p. 109

(9) SHANBERGE, J.N., and I. GORE: Studies on the immunologic and physiologic activities of antihemophilic factor (AHF). J. Lab. Clin. Med. 50:954 (1957)

(10) BERGLUND, G.: Studies of the inhibitory activity of specific antisera to some clotting factors in human plasma. Brit. J. Haemat. 8:204 (1962)

(11) GRAHAM, J.B., and E.M. BARROW: The pathogenesis of hemophilia. J. exp. Med. 106:273 (1957)

(12) BIGGS, R., and A.S. DOUGLAS: The thromboplastin generation test. J. Clin. Path. 6:23 (1953)

(13) GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS jr.: Méthode permettant l'étude conjugée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange des protéines. Biochim. Biophys. Acta 10:193 (1953)

(14) OUCHTERLONY, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5:1 (1958)

(15) BARILLIER, J., E. WATZKE und H. GIBIAN: Einfache Apparatur für die trägerfreie, präparative Durchlaufelektrophorese. Zeitschr. Naturforschg. 13b:75 (1958)

(16) WIEK, K.: Über eine Modifikation der trägerfreien, präparativen Durchflußelektrophorese. Inaug. Diss., Berlin, 1962

(17) JUNG, E. G. and F. DUCKERT: Wirkung von Plasmin (Fibrinolysin) auf die Gerinnungsfaktoren. Schweiz, Med. Wschr. 44:1239 (1960)

(18) KRÜGER, J.: Untersuchungen über die Fibrinolyse mit immunologischen Methoden. Inaug. Diss. Berlin, 1963.

(19) BLOMBÄCK, B., M. BLOMBÄCK, and J. STRUWE: Studies on Factor VIII. "Progress in coagulation". Schattauer, Stuttgart, 1962, p. 172

(20) NILEHN, J. E.: On symptomatic Antihemophilic globulin deficiency Acta Med. Scand. 171:491 (1962)

(21) JOHNSON, S. A. and W. H. SEEGERS: Platelet cofactor I activity in the hemophilias. "Hemophilia and hemophiloid diseases", edit. K. M. BRINKHOUS. Univ. of North Carolina Press, 1957

(22) RICHARDS, M. D. and T. H. SPAET: Immunization of rabbits against human antihemophilic factor. Blood 11:473 (1956)

(23) LERNER, P. and C. YANOFSKI: An immunological study of mutants of Escherichia coli lacking the enzyme tryptophan synthetase. J. Bact. 74:494 (1957)

(24) YANOFSKI, C.: Antibodies to the two protein compounds of Escherichia coli tryptophan synthetase. Ann. M. Y. Acad. Sci. 103:1067 (1963)

(25) SUSKIND, S. R., C. YANOFSKI, and D. M. BONNER: Allelic strains of Neurospora lacking tryptophan synthetase: a preliminary immunochemic characterization. - Proc. Natl. Acad. Sci. 41: 557 (1955)

(26) SUSKIND, S.R., M.L.WICKHAM, and M.S.CARSIOTIS: Antienzymes in immunogenetic studies. Ann. N.Y. Acad. Sci. 103:1106 (1963)

(27) FANTL, P., R.J.SAWERS and A.G.MARR: Investigation of a hemorrhagic disease due to beta-prothromboplastin deficiency complicated by a specific inhibitor of thromboplastin formatin. Austral. Ann. Med. 5:164 (1956)

(28) DEUTSCH, E.: Aquired inhibitors. "Progress in coagulation". Schattauer, Stuttgart, 1962, p. 112

(29) BRECKENRIDGE, R.T. and O.D.RATNOFF: Studies on the nature of the circulating anticoagulant directed against antihemophilic factor. Blood 20:137 (1962)

(30) NUSSENZWEIG, V., M.SELIGMANN, et P.GRABAR: Les produits de degradation du fibrinogène humain par la plasmine. II. Étude immunologique: Mise en évidence d'anticorps anti-fibrinogène natif possédant des spécificités différents. Ann. Inst. Pasteur 100:490 (1961)

(31) LAPRESLE, C.: Étude de la dégradation de la sérum-albumine humaine par un extrait de rate de lapin. II. Mise en evidence de trois groupements specifiques différents dans le motif antigénique de l'albumine humaine et de trois anticorps correspondants dans le sérum de lapin anti-albumine humaine.
Ann. Inst. Pasteur 89:654 (1955)

(32) GRAHAM, J.B.: Biochemical genetics of blood coagulation. Americ. J. Hum. Gen. 8:63 (1956)

Für die Überlassung des Themas möchte ich
Herrn Professor Dr. G. Schettler danken.

Mein besonderer Dank für unermüdliche Anleitung und Beratung
gilt Herrn Dr. W. Piper.

Herrn Dr. Osten, Städt. Rudolph Virchow-Krankenhaus,
danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Beschaffung
von Hämophilie A-Blut.

Für seine Mitarbeit bei der trägerfreien, elektrophoretischen
Auftrennung des Immunserums bin ich Herrn Dr. Wiek, Städt.
Rudolph Virchow-Krankenhaus, zu Dank verpflichtet.

LEBENSLAUF

28. Juni 1938	geboren in Mamming, Ndb.
September 1944	Eintritt in die Volksschule Auerbach, Oberpfalz
September 1949	Eintritt in die Oberrealschule Hersbruck, Mittelfranken
Juni 1958	Abitur am Realgymnasium in Donauwörth
November 1958	Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Tübingen
Oktober 1959	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
April 1961	Ärztliche Vorprüfung an der Universität Münster, Westfalen
November 1961	Fortführung des Studiums an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
März 1965	Staatsexamen

Vervielfältigt: W. H I L K E , Berlin 15, Joachimstaler Straße 16